

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 43 28 639 A 1

⑯ Int. Cl. 6:
A 61 B 5/055
A 61 K 49/00
G 01 N 24/10
// C07C 207/02, C07D
207/27, 207/46,
263/26, 211/92

⑯ Aktenzeichen: P 43 28 639.9
⑯ Anmeldetag: 23. 8. 93
⑯ Offenlegungstag: 2. 3. 95

DE 43 28 639 A 1

⑯ Anmelder:
Lancaster Group AG, 67059 Ludwigshafen, DE
⑯ Vertreter:
Felke, H.; Walter, W., Pat.-Anwälte, 10367 Berlin

⑯ Erfinder:
Herrling, Thomas, Dr., 13189 Berlin, DE; Groth, Norbert, 10435 Berlin, DE; Fuchs, Jürgen, Dr., 63811 Stockstadt, DE; Zastrow, Leonhard, Prof. Dr., Monaco, MC; Stanzl, Klaus, Dr., White Plains, N.J., US

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren zur Messung des antioxidativen Potentials der Haut

⑯ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung des antioxidativen Potentials der Haut sowie eine Zubereitung zur Verwendung in einem solchen Verfahren. Das Problem auf diesem Gebiet besteht darin, daß das Vorhandensein einzelner Antioxidantien oder von deren Oxidationsprodukten in der Haut *in vitro* nachgewiesen werden konnte oder auch das Eindringen von Radikalen in die Haut, nicht jedoch das gesamte in der Haut zur Verfügung stehende antioxidative Potential. Erfindungsgemäß besteht das Verfahren zur Messung des antioxidativen Potentials darin, daß
(a) eine transdermale Zubereitung auf die Haut aufgetragen wird, bestehend aus einem physiologisch annehmbaren, in die Haut eindringenden Trägerstoff und einer physiologisch annehmbaren, paramagnetischen Modellsubstanz in Form eines freien Radikals tragenden Nitroxids oder Nitroxidgemisches, die in der Haut durch Antioxidantien innerhalb von 5 bis 60 Minuten abgebaut werden;
(b) eine gemäß (a) behandelte Haut einer oxidativen Stress erzeugenden Behandlung unterzogen wird;
(c) die magnetischen Momente der freien Elektronen der Nitroxidradikale mittels der paramagnetischen Elektronenresonanz (EPR) nicht-invasiv gemessen werden; und
(d) die unter (c) erhaltenen Meßwerte der Intensität des low-field-Peaks oder des mid-field-Peaks des EPR-Spektrums als zeitabhängige Intensität erfaßt und im Vergleich mit nur gemäß (a) behandelter und danach gemäß (c) gemessener Haut als relative Intensität und Maß für das antioxidative ...

DE 43 28 639 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
BUNDESDRUCKEREI 01.95 408 069/220

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung des antioxidativen Potentials der Haut sowie eine Zubereitung zur Verwendung in einem solchen Verfahren.

Jede Zelle besitzt ein antioxidatives Potential, das durch die Balance zwischen den Faktoren, die die Autoxidation ausüben und denen, die die antioxidative Wirkung hervorrufen, bestimmt wird. Dabei steht den in der Haut vorhandenen Antioxidantien ein Vorgang gegenüber, der unter dem Sammelbegriff "oxidativer Stress" die physiologischen Einflüsse von hautspezifischen Stoffwechselreaktionen sowie exogene Faktoren wie ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung, Photosensibilisierung, toxische und allergische Kontaktdermatitis usw. umfaßt und der eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Oxidantien und damit ein Auftreten molekularer Schäden bewirkt.

Die Antioxidantien haben die Aufgabe, die biologisch reaktiven Oxidantien wie z. B. das Superoxid-Anionradikal, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale, Singulett-Sauerstoff, Übergangsmetalle, Radikalchelate, Hydroperoxide, Lipidradikale und Thiyl-Radikale abzubauen, um oxidative Zell- und Gewebeschäden zu vermeiden. Angriffsziele der Oxidantien z. B. in der Haut sind Lipide, Proteine, Kohlehydrate und Nukleinsäuren.

Aufgrund der niedrigen Konzentration der freien Radikale im Gewebe, der extrem hohen Reaktionsfreudigkeit, der geringen biologischen Halbwertzeit von einigen Nano- bis Millisekunden und dem komplexen Aufbau der Haut in mehreren biochemischen und morphologisch verschiedenen Abschnitten, ist der Nachweis freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies in der Haut methodisch sehr schwierig und nur für einzelne Spezies möglich (Spin-Trap-Technik). Ein weiterer erschwerender Faktor ist die Vielzahl der chemisch sich überlagernden Verbindungen im biologischen Material. Der qualitative und quantitative Nachweis von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies in biologischem Material erfordert hochentwickelte Analysentechniken. Der direkte Nachweis reaktiver Oxidantien bzw. von deren Oxidationsprodukten im biologischen Material kann in vereinzelten Fällen mit komplizierten technischen Methoden erbracht werden. Sehr oft ist jedoch der direkte Nachweis in vitro und in vivo nicht möglich. Indirekte Bestimmungsmethoden, wie die Messungen des Konzentrationsanstiegs an Peroxidationsprodukten und Konzentrationsverminderung der Antioxidantien sind häufig durchgeführte Verfahren.

Ein indirektes Verfahren zur Erfassung reaktiver Oxidantien in vitro ist die quantitative Bestimmung von spezifischen Reaktionsprodukten, z. B. Peroxidationsprodukten der Lipide, Nukleinsäuren und Proteine. Der Thiobarbitursäure-Test, diskutiert von Gutteridge, 1986, JMC, Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. Free Radical Research Communication, 1 : 173-184, in der Literatur als einfach und sensitiv beschriebenes Verfahren, weist neben Lipidperoxidationsprodukten auch Ketosäuren und Nucleinsäuren nach und ist nicht geeignet zur Messung der Lipidperoxidationskinetik. Die Bestimmung von Lipidperoxidationsprodukten der Zellmembranen mit der optischen Spektroskopie transparenter Lösungen zeigt hingegen nur Schäden an den Zellmembranen selbst, so daß eine qualitative und quantitative Analyse der Lipidoxidation in biologischem Material schwierig erscheint.

Molekularer Sauerstoff ist das Substrat für die Bildung des Superoxid-Anionradikals, von Wasserstoffper-

oxid und des Hydroxylradikals. Die quantitative Bestimmung des Sauerstoffs mit der Methode Oxypolarographie ermöglicht indirekt die Erfassung reaktiver Sauerstoffspezies, wenn die zelluläre Atmung (4 Elektronen Reduktion des Sauerstoffs) gering ist und der Sauerstoffverbrauch durch Ein-Elektronen-Transfer (radikalische Reaktion) dominiert. Dies ermöglicht in der Regel in vitro-Messungen an Zellorganellen oder isolierten Zellen nach Hemmung der physiologischen Atmung durch Cyanid.

Antioxidantien wie Glutathion, Ascorbat und Tocopherol werden durch reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale oxidiert. Die Bestimmung der Konzentration der Antioxidantien oder von deren Oxidationsprodukten mit sensitiven Meßmethoden (z. B. HPLC mit elektrochemischer, spektrophotometrischer oder fluorimetrischer Detektion) ermöglicht eine isolierte Erfassung reaktiver Oxidantien in verschiedenen Gewebe-Kompartimenten. Nachteile der Methode sind, daß Rückschlüsse auf die chemische Natur des reaktiven Oxidans nicht eindeutig möglich sind, die Probengewinnung invasiv ist und Präparationsartefakte auftreten können.

Das Verfahren zur Messung der Biolumineszenz ist zwar ein hochempfindliches Meßverfahren und durch Auswahl spezieller Inhibitoren und Wellenlängenbereiche erzielt die Methode eine hohe Selektivität, hat jedoch den Nachteil der direkten Erfassung von Lichtquanten als ein Parameter für die Radikalbildung, sowie die Nichtanwendbarkeit für Untersuchungen radikalischer Reaktionen ohne Entstehung von Chemilumineszenz und eine begrenzte Anwendbarkeit für in vivo-Messungen.

Aus der EP-A-351919 ist bekannt, daß deuterierte Nitroxidradikale in der ESRENRI (Electron Spin Resonance Enhanced Magnetic Resonance Imaging) als kontrastgebende Komponente (Kontrastmittel) verwendet werden können. Dabei erfolgt jedoch eine Messung der Beeinflussung der Relaxationszeit der Wasserstoffkerne zum Zwecke der Verbesserung des Bildkontrastes bei der NMR-Tomographie mit möglichst dauerhaft stabilen Nitroxiden, die auch nach der Messung als solche im Körper verbleiben.

In einer Veröffentlichung in Magnetic Resonance Microscopy, Verlag Chemie Weinheim 1992, 563, wird die Penetration von Spin-Markern und die spektrale Veränderung der Linien von Proxylmaleimid mittels spezieller EPR-Technik untersucht.

Insgesamt besteht das Problem auf diesem Gebiet darin, daß das Vorhandensein einzelner Antioxidantien oder von deren Oxidationsprodukten in der Haut in vitro nachgewiesen werden konnte oder auch das Eindringen von Radikalen in die Haut, nicht jedoch das gesamte in der Haut zur Verfügung stehende antioxidative Potential. Dies wäre jedoch eine entscheidende Größe für die Vergleichbarkeit bestimmter Mittel gegen antioxidative Beanspruchung (Stress) der Haut.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Bestimmung des antioxidativen Potentials auf der Haut und eine transdermale Zubereitung dafür bereitzustellen.

Erfindungsgemäß besteht das Verfahren zur Messung des antioxidativen Potentials darin, daß

(a) eine transdermale Zubereitung auf die Haut aufgetragen wird, bestehend aus einem physiologisch annehmbaren, in die Haut eindringenden Trägerstoff und einer physiologisch annehmbaren, para-

magnetischen Modellsubstanz in Form eines freien Radikale tragenden Nitroxids oder Nitroxidgemisches, die in der Haut durch Antioxidantien innerhalb von 5 bis 60 Minuten abgebaut werden, wobei die Konzentration der Modellsubstanz im Bereich von 1 bis 100 mMol liegt;

(b) eine gemäß (a) behandelte Haut einer oxidativen Stress erzeugenden Behandlung unterzogen wird;

(c) die magnetischen Momente der freien Elektronen der Nitroxidradikale mittels der paramagnetischen Elektronenresonanz (EPR) nicht-invasiv unter den Bedingungen Mikrowellenleistung 1 bis 20 mM, Frequenzbereich 1 bis 10 GHz, Einsatz einer Oberflächenspule, Linienbreite der Modellsubstanz 0,1 bis 5 Gauss (0,1 bis 5 T) gemessen werden; und (d) die unter (c) erhaltenen Meßwerte der Intensität des lowfield-Peaks oder des mid-field-Peaks des EPR-Spektrums als zeitabhängige Intensität erfaßt und im Vergleich mit nur gemäß (a) behandelter und danach gemäß (c) gemessener Haut als relative Intensität und Maß für das antioxidative Potential der Haut ausgewiesen werden.

Mit der EPR wird der Nachweis des ungepaarten Elektrons des Radikals der Modellsubstanz (Nitroxid) ermöglicht.

Ausgehend von einer relativ schnellen Abbaubarkeit im Zeitraum von 5 bis 60 Minuten eignen sich als Modellradikale 5- und 6-Ringsysteme, zu denen die folgenden Nitroxide gehören:

Proxo (2,2,5,5-Tetramethyl-1-dihydropyrroloxy-nitroxid),

Proxad (2,2,5,5-Tetramethyl-1-dihydropyrroloxy-nitroxid)

Doxo (2,2,5,5-Tetramethyl-3-oxazolidinoxy-nitroxid),

Tempo (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinoxy-nitroxid),

Tempol (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinoxy-4-ol-nitroxid),

CAT 1 (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinoxy-4-trimethylammoniumbromid-nitroxid). Diese Verbindungen sowie die Verbindung DTBN (Di-tert-Butyl-nitroxid) mit besonders kleinem Molekül haben eine geringe Stabilität, d. h. sie sind leicht abbaubar im Bereich der vorgesehenen Meßzeit, sie haben ein gutes Diffusionsverhalten beim Eindringen in das zu untersuchende Objekt, und sie sind physiologisch verträglich.

Die Abbauzeit eines Modellradikals liegt im Bereich von 10 bis 60 Minuten, vorzugsweise 10 bis 30 Minuten. Unter dem hier verwendeten Begriff "Abbauzeit" wird die Zeit verstanden, in der das Radikal neutralisiert wird (Reduktion).

Die Löslichkeit der Modellradikale richtet sich nach dem Einsatzgebiet (Target). Für die dermatologische Verwendung sind Transportsysteme auf der Basis von Liposomen oder Mikroemulsionen möglich. Auch der Einsatz von mit Fluorcarbonen hergestellten asymmetrischen lamellaren Aggregaten (DE-A-42 21 255) als Trägersystem ist möglich.

Bei der praktischen Durchführung des Verfahrens wird zur Bestimmung des antioxidativen Potentials eines biologischen Systems dem zu untersuchenden System ein Modellradikal in einer Konzentration von 1 bis 100 mMol, zum Beispiel 10 mMol zugesetzt und die EPR-Signalintensität (low field peak oder mid field peak des Spektrums) nach einer definierten Zeit t gemessen. Diese relative Intensität I_r wird als "0" gesetzt.

Zur Bestimmung des relativen antioxidativen Potenti-

als wird die Größe A_p definiert, die ein Maß für das relative AOP darstellt:

$$A_p(t, k) = 1 - I_r(t, k)$$

wobei k ein Maß für die Konzentration des verwendeten Modellradikals darstellt. Entsprechend $I_r = 0$ ergibt sich $A_p = 1$. Zur Bestimmung der relativen Signalintensität I_r werden die Parameter Meßzeitpunkt t und Modellradikalkonzentration k für eine Meßreihe konstant gehalten.

In einem zweiten Schritt wird das biologische System dem zu untersuchenden oxidativen Stress ausgesetzt, wobei es sich beispielsweise um eine endogene Entzündungsreaktion oder exogene Beeinflussung durch elektromagnetische Strahlung (UV-Strahlung, radioaktive Strahlung, Wärmestrahlung) oder mechanische Einwirkungen (Schlag, Pressung) handeln kann. Der erhöhte oxidative Stress führt zu einem verlangsamten Abbau des anschließend zugeführten Modellradikals. Je nach der Größe des oxidativen Stresses wird die gemessene Intensität I_r größer als 0 sein. Dementsprechend ergibt sich ein antioxidatives Potential des untersuchten biologischen Systems, das kleiner als 1 ist.

Werden dem betrachteten biologischen System Antioxidantien, wie beispielsweise Ascorbat und/oder Tocopherol zugeführt, so wird das AOP wieder erhöht, d. h. A_p steigt an.

Die Unterschiedlichkeit der physiologisch vorkommenden Antioxidantien, die auch bedingt sind durch eine Vielzahl von reaktiven Oxidantien, führt zu unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten mit den Modellradikalen. So reduziert beispielsweise Ascorbat bevorzugt Piperidin-Nitroxide, wohingegen die Reaktionsgeschwindigkeit mit Pyrrolidin-Nitroxiden gering ist. Piperidin-Nitroxide werden im Gegensatz zu Pyrrolidin-Nitroxiden NADPN-abhängig durch Thioredoxin-Reduktase reduziert. Thioredoxin-Reduktase komplementiert das Ascorbat als Reduktionsmittel für Nitroxidradikale. Die Nitroxidreduktion wird beispielsweise durch NADPH, NADP und NADH stimuliert. Liposomal gebundenes Nitroxid kann durch Ascorbat, nicht aber durch Thioredoxin-Reduktase reduziert werden.

Die relativ hohe Reduktionsrate von Pyrrolidin-Nitroxiden in der Haut läßt darauf schließen, daß dort noch andere Reduktantien als Ascorbat und Thioredoxin vorhanden sind.

Das eingesetzte Modellradikal enthält semistabile Nitroxidradikale, deren hohe chemische Selektivität eine Reduktion durch Enzyme und spezifische Antioxidantien wie Glutathion, Ascorbat und Tocopherol begünstigt. Durch Auswahl einzelner Testsysteme wie Piperidin-Nitroxid kann das AOP entsprechender Antioxidantien wie z. B. Ascorbat selektiv gemessen werden.

Durch die Verwendung von perdeuterierten und ^{15}N -markierten Nitroxidradikalen kann die Signalintensität und damit die Empfindlichkeit des Verfahrens um ein Vielfaches erhöht werden.

Eine weitere Verbesserung des Verfahrens besteht darin, daß mit Hilfe EPR-Tomographie das antioxidative Potential räumlich aufgelöst werden kann. Eine besonders günstige Verfahrensvariante ist die mit modulierten Gradienten. Diese Variante ermöglicht eine schichtweise Messung des antioxidativen Potentials beispielsweise in der Haut, wodurch entsprechende Rückschlüsse auf die Effizienz medizinischer oder kosmetischer Behandlung der Haut gezogen werden können. Eine nähere Erläuterung zu diesem Verfahren ist in der

bereits zitierten Literaturstelle Magnetic Resonance Microscopy enthalten, auf die in diesem Zusammenhang ausdrücklich Bezug genommen wird.

Mit der vorliegenden Erfindung wird erstmals der Begriff des antioxidativen Potentials eingeführt und zugleich ein einfaches und gut vergleichbare Meßergebnisse bietendes Verfahren bereitgestellt. Die verwendeten Modellsubstanzen sind in der angewandten Konzentration hautverträglich und werden durch Antioxidationsmittel problemlos abgebaut. Das Verfahren ist wiederholbar, während bisherige *in vitro*-Verfahren immer nur den Einzelnachweis eines Antioxidans innerhalb einer bestimmten Gewebeprobe erbrachten und damit einen Zustand "nach" dokumentierten. Das neue Verfahren bietet dadurch eine bisher einzigartige Möglichkeit, am Lebewesen Antioxidationspotentiale nicht nur der Haut an sich, sondern auch Potentiale in verschiedenen Schichttiefen nachzuweisen und damit die Eindringtiefe von kosmetisch oder medizinisch aufgetragenen Antioxidantien.

Die Erfindung soll nachstehend durch Beispiele näher erläutert werden. In der dazugehörigen Zeichnung ist Fig. 1 eine grafische Darstellung des in den Beispielen 1, 2 und 3 mit der dazugehörigen Kurve 1, 2 und 3 gemessenen AOP über die Gesamtzeit.

Zur Messung des AOP an der Haut wurde das AOP anhand der Abnahme der Radikalkonzentration des Modellradikalsystems CAT 1 für drei unterschiedliche exogene Einflußfaktoren gemessen.

Beispiel 1 Bestrahlung mit UVA/B

Die Haut wurde mit UVA/B bestrahlt. Nach einer dreifachen MED (minimaler Erythema-Dosis) wurde die Modellsubstanz CAT 1 in einer Konzentration von 10 mMol in einer Mikroemulsion mit PEG 80 als Trägersubstanz transdermal appliziert. Die Konzentration des Modellradikals wurde im Abstand von 5 Minuten gemessen; Mikrowellenleistung 20 mM; Frequenz 3,5 GHz. Nach $t = 25$ Minuten betrug die Radikalkonzentration noch $I_r = 0,23$. Danach erhielt man in diesem Fall nach 25 Minuten ein $A_p = 0,77$.

Beispiel 2 Bestrahlung und Verstärkung mit 8-Methoxy-Psoralen

In diesem Beispiel wurde mit 8-Methoxy-Psoralen der Haut eine Substanz zugefügt, die die Bildung von reaktiven Oxidantien bei UV-Bestrahlung begünstigt. Nach der anschließenden Applikation des Modellradikals wie im Beispiel 1 und Messungen im Abstand von 5 Minuten betrug die Radikalkonzentration nach 25 Minuten noch $I_r = 0,36$, so daß sich ein $A_p = 0,64$ ergab.

Beispiel 3 UV-Bestrahlung und Antioxidans-Zusatz

In diesem Beispiel wurde die Haut vor der Bestrahlung mit einer antioxidativen Komposition (enthaltend z. B. Tocopherol, Ascorbat) behandelt. Die durchgeführte Messung mit der Modellsubstanz wie in Beispiel 1 nach einer bei gleicher Dosis wie im Beispiel 1 erfolgten Bestrahlung ergab nach 25 Minuten den Abfall des Radikalsignals auf 6%. Daraus ergab sich ein antioxidatives Potential von $A_p = 0,94$. Das an der Haut vor der Bestrahlung gemessene antioxidative Potential hatte einen Wert $A_p = 0,86$. Der Vergleich der A_p -Werte zeigt deutlich eine Zunahme des AOP in der Haut nach der äußerlichen Anwendung von Antioxidantien und damit

eine genaue Widerspiegelung der Veränderung des AOP, das mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens bestimmt werden konnte.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung des antioxidativen Potentials in der lebenden Haut, dadurch gekennzeichnet, daß

(a) eine transdermale Zubereitung auf die Haut aufgetragen wird, bestehend aus einem physiologisch annehmbaren, in die Haut eindringenden Trägerstoff und einer physiologisch annehmbaren, paramagnetischen Modellsubstanz in Form eines freien Radikale tragenden Nitroxids oder Nitroxidgemisches, die in der Haut durch Antioxidantien im Bereich von 5 bis 60 Minuten abgebaut werden, wobei die Konzentration der Modellsubstanz im Bereich von 1 bis 100 mMol liegt;

(b) eine gemäß (a) behandelte Haut einer oxidativen Stress erzeugenden Behandlung unterzogen wird;

(c) die magnetischen Momente der freien Elektronen der Nitroxidradikale mittels der paramagnetischen Elektronenresonanz (EPR) nicht-invasiv unter den Bedingungen Mikrowellenleistung 1 bis 20 mM, Frequenzbereich 1 bis 10 GHz, Einsatz einer Oberflächenspule, Linienbreite der Modellsubstanz 0,1 bis 5 Gauss (0,1 bis 5 T) gemessen werden; und

(d) die unter (c) erhaltenen Meßwerte der Intensität des lowfield-Peaks oder des mid-field-Peaks des EPR-Spektrums als zeitabhängige Intensität erfaßt und im Vergleich mit nur gemäß (a) behandelter und danach gemäß (c) gemessener Haut als relative Intensität und Maß für das antioxidative Potential der Haut ausgewiesen werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Modellsubstanz ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus Nitroxiden wie Proxo (2,2,5,5-Tetramethyl-1-dihydropyrrolinoxy-nitroxid), Proxad (2,2,5,5-Tetramethyl-1-dihydropyrroloxy-nitroxid), Doxo (2,2,5,5-Tetramethyl-3-oxazolidinoxy-nitroxid), Tempo (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinoxy-nitroxid), Tempol (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinoxy-4-ol-nitroxid), CAT 1 (2,2,6,6-Tetraethyl-1-piperidinoxy-4-trimethylammoniumbromid-nitroxid), DTBN Di-tert-butyl-nitroxid besteht.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Nitroxide so ausgewählt werden, daß deren Abbauzeit durch Antioxidantien im Bereich von 10 bis 30 Minuten liegt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerstoff eine physiologisch annehmbare, das Stratum corneum durchdringende Substanz ist, ausgewählt unter Liposomen, Mikroemulsionen, alkoholischen Auszügen und asymmetrischen lamellaren Aggregaten.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitroxidradikal perdeute-

riert oder ¹⁵N-markiert ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitroxidradikal als Gemisch in Form einer Emulsion lipophiler und hydrophiler Nitroxidradikale vorliegt. 5

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als paramagnetisches Elektronenresonanzverfahren die EPR-Tomografie mit moduliertem Gradienten eingesetzt und das antioxidative Potential in verschiedenen Hautschichten mit einer Auflösung von 10 bis 100 µm gemessen und räumlich dargestellt wird. 10

8. Transdermale Zubereitung zur Verwendung bei der nicht-invasiven Messung des antioxidativen Potentials in der Haut mittels der EPR oder EPR-Tomografie, wobei die Zubereitung eine physiologisch annehmbare, lipophile und/oder hydrophile, paramagnetische Modellsubstanz mit freien Radikalen enthält, mit der Antioxidantien in der Haut innerhalb von 5 bis 60 Minuten abgebaut werden, 20 und einen physiologisch annehmbaren Träger. 15

9. Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Modellsubstanz ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus Nitroxiden wie Proxo (2,2,5,5-Tetramethyl-1-dihydropyrrolinoxy- 25 nitroxid), Proxad (2,2,5,5-Tetramethyl-1-dihydropyrroloxy-nitroxid), Doxo (2,2,5,5-Tetramethyl-3-oxazolidinoxy-nitroxid), 30 Tempo (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinoxy-nitroxid), Tempol (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinoxy-4-ol-nitroxid), CAT 1 (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinoxy-4-trime-thylammoniumbromid-nitroxid), 35 DTBN Di-tert.-butyl-nitroxid

besteht.

10. Zubereitung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Abbauzeit der paramagnetischen Modellsubstanz durch Antioxidantien im Bereich von 10 bis 30 Minuten liegt. 40

11. Zubereitung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerstoff eine physiologisch annehmbare, das Stratum corneum durchdringende 45 Substanz ist, ausgewählt unter Liposomen, Mikroemulsionen, alkoholischen Auszügen und asymmetrischen lamellaren Aggregaten.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitroxidradikal 50 perdeuteriert oder ¹⁵N-markiert ist.

13. Zubereitung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitroxidradikal als Gemisch in Form einer Emulsion lipophiler und hydrophiler Nitroxidradikale vorliegt. 55

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

